ESPEMATOGENESIS DE **PHERETIMA HAWAYANA** (ROSA (Oligochaeta, Megascolecidae)

A. M. ALDERETE DE MAJO (*), Z. TOMSIC (*), F. DULOUT (**) y
E. S. TEISAIRE (***)

SUMMARY

The spermatogenesis of *Pheretima hawayana* (Rosa) was studied from an eminently cytogenetic point of view, leaving aside the classic histological techniques. Instead a previosly tested and modified air-drying technique for Oligochaeta was employed.

It was determined that there is a normal developmental process from protogonia and spermatogonia. These cells undergo 5 synchronous premeiotic mitosis (spermatogonic groups of 2, 4, 8, 16 cells and spermatocytes I of 32 elements) and the meiotic division (spermatocytes II and spermatids 64 and 128 elements respectively) leading to the formation of viable gametes. This last fact was confirmed by direct observation of the spermatozoons in the seminal receptacles or spermathecae.

INTRODUCCION

El conocimiento de los procesos de espermatogénesis y espermiogénesis en los oligoquetos terrícolas, se basa en estudios morfológicos de numerosos autores. Ellos han brindado una información generalizada del proceso, poniendo en evidencia una serie de hechos biológicamente importantes pero, dadas las limitaciones surgidas de la misma metodología empleada, las posibilidades de profundizar sobre el tema están relacionadas al empleo de técnicas diferentes.

Es por eso que el presente trabajo tiene por objeto efectuar el análisis de la espermatogénesis desde un punto de vista citogenético, dejando de lado las técnicas histológicas clásicas y empleando una técnica de air-drying modificada por nosotros, para oligoquetos, cuyo detalle implica una de las pautas principales a encarar.

(*) Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Tucumán.

(**) Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE) La Plata, Buenos Aires.

(***) Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad Nacional de Tucumán.

MATERIAL Y METODOS

Para proceder al estudio de los elementos de la espermatogénesis de *P. hawayana* (Rosa), se utilizaron 20 ejemplares sexualmente maduros de dicha especie, los que fueron recolectados en distintas zonas de la ciudad de San Miguel de Tucumán y estudiados en forma individual.

Después de la identificación taxonómica, se procedió a la narcosis de los animales en alcohol diluído y seguidamente se extrajeron los testículos y vesículas seminales. Ellos fueron procesados según los pasos que a continuación se detallan:

Las vesículas y testículos se colocaron juntos en vidrio de reloj en un medio salino balanceado de pH 7,4 y conservado a 4ºC. La composición del mismo es la que sigue:

NaCl	250 cc
KCl	5 cc
$CaCl_2$	5 cc
$MgCl_2$	1 cc
Na_2SO_4	1 cc
Buffer fosfato de Sörensen (pH 7,4)	100 cc

Por medio de tijeras, el material fue fragmentado en trozos muy pequeños.

El material así obtenido, se trasladó a un tubo de centrífuga graduado en el cual fue disgregado con ayuda de una pipeta Pasteur.

La suspensión se centrifugó durante 5 minutos a 800 r.p.m.; se extrajo el sobrenadante, agregando seguidamente 1,5 ml de solución tamponada y resuspendiendo.

Centrifugado igual que en el paso anterior; extracción de 1 ml del sobrenadante y resuspensión del material en los 0,5 ml restantes.

Agregado lento por las paredes del tubo de 1,5 ml de agua destilada y resuspensión suave. Esta solución hipotónica se dejó actuar durante 7 minutos a temperatura ambiente, centrifugando nuevamente.

Extracción del sobrenadante y agregado lento (por las paredes del tubo) del fijador (3 partes de alcohol metílico absoluto y 1 parte de ácido acético glacial) sin remover el material sedimentado.

Reposo en fijador durante por lo menos 2 horas (generalmente de 6 a 12 horas).

Lavado de las células en fijador fresco por centrifugación y en las mismas condiciones anteriores.

Igual al último paso citado.

Resuspensión en una cantidad apropiada de fijador, acorde a la cantidad de células disponibles.

Confección de los preparados por medio de goteo de la suspensión sobre portaobjetos enfriados en agua destilada helada y secados en corriente de aire caliente.

Coloración con Giemsa tamponado a pH 7 durante 5 minutos, con Carbol-Fucsina según Carr y Walker (2) y con técnica de Gram Nicolle (11).

RESULTADOS

Como resultado de la técnica empleada, fue posible estudiar los procesos de espermatogénesis y espermiogénesis de manera tal que sus formas celulares y agrupaciones de las mismas, se presentaban perfectamente aisladas y visibles con claridad. Es así que se pudo individualizar a cada una de ellas y, en el caso de las agrupaciones, realizar un recuento de los elementos intengrantes. Los conglomerados celulares corresponden a los folículos y mórulas citadas por Stephenson (10), términos estos últimos que consideramos innecesarios para la comprensión del proceso.

A continuación se detallan las diferentes variedades de células encontradas:

Protogonias: representadas por células de núcleos ovalados, de tamaños que oscilan entre los 7,5 a los 10,5 μm, con gránulos de cromatina variables y heteropicnóticos, no habiendo sido nunca observadas en grupos sino sólo en forma dispersa (Foto Nº 1).

Espermatogonias: células de núcleos esféricos, de tamaño variable y decreciente a medida que los grupos aumentan en número de elementos (10 a 6,5 μm), con gránulos de cromatina muy fina y dispersa, conforme a lo cual aparecen más débilmente teñidas que los núcleos de las protogonias y que raramente presentan sus componentes condensados. Efectivamente, sólo durante los estadios mitóticos el material cromosómico forma masas densas (Fotos Nº 5, 7 y 8).

Fueron encontradas en forma aislada y agrupadas en forma diversa, en números que siguen una progresión geométrica de 2, 4, 8 y 16 elementos, hecho que lleva, como lo anticipáramos previamente, a una disminución paulatina de tamaño, como asimismo a una creciente condensación del material cromatínico (Fotos Nº 2, 3, 4 y 6). La formación de estos conglomerados celulares se lleva a cabo por cuatro sucesivas mitosis sincrónicas y premeióticas, las que son seguidas por una quinta división que da por resultado a los espermatocitos I, elementos que pasamos a describir.

Espermatocitos I: núcleos esféricos, de tamaño menor que las espermatogonias (6 a 4 μm), de aspecto variable de acuerdo a los distintos estadios, pudiendo aparecer granulosos a semejanza de las espermatogonias o condensados en mayor o menor grado. Se presentan en grupos de 32 elementos (Fotos Nº 9 y 10).

Una vez iniciada la meiosis, se desarrollan los espermatocitos II, cuyas características son las siguientes:

Espermatocitos II: núcleos muy condensados, salvo las figuras mitóticas en profase (Foto Nº 12), de tamaño evidentemente menor que los anteriores

(4,5 a 3 μm) y que se presentan en agrupaciones de 64 elementos. Aparte de los caracteres citados, se diferencian de los espermatocitos I por la presencia del citóforo, que aparece en este estadio y que describiremos posteriormente (Foto Nº 11).

Espermátidas: Células con núcleos de gran variación morfológica, presentando formas esféricas hasta alargadas y ahusadas. Son similares a los espermatocitos II en lo que a condensación de los núcleos se refiere y se caracterizan por constituir agrupaciones de hasta 128 elementos (Foto Nº 13).

Los dos últimos estadios mencionados se encuentran siempre relacionados con el citóforo. Este presenta el aspecto de una masa amorfa a cuyo alrededor se disponen los elementos celulares (espermatocitos II y espermátidas). A veces pudo observarse homogéneamente coloreada aunque se manifestaron en ella distinto número de puntuaciones heteropicnóticas (con coloración de Carbol-Fucsina).

Formas de transición entre espermátidas y espermatozoides maduros: se observaron en forma ahusada que se alarga gradualmente hasta adquirir la morfología típica del espermatozoide maduro (Foto Nº 14).

Espermatozoides: con la técnica de coloración con Giemsa, difícilmente pudieron ser observados en su totalidad; en efecto, se tiñeron con mayor intensidad las cabezas, mientras que las colas lo hicieron débilmente o nada. Las primeras corresponden a los núcleos de los espermatozoides; son alargadas, delgadas y de una longitud que oscila entre 22,5 a 17 μm. En algunos ejemplares fue posible observar estas regiones bandeadas, interpretándose como cromosomas a las más intensamente coloreadas (Foto Nº 16).

Sin embargo, empleando la técnica de Gram-Nicolle, los espermatozoides se colorearon en su totalidad, haciéndose así evidentes las colas de los mismos. Estas se presentan menos oscuras que las cabezas y con una longitud de 100 μm, de manera tal que el largo es de unas 120 μm (Foto Nº 15).

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los datos obtenidos permiten concluir que la espermatogénesis de *Pheretima hawayana* (Rosa), sigue un desarrollo normal y concluye con la formación de gametas viables, hecho que se comprueba por la presencia de espermatozoides en las espermatecas, en las que se depositan las gametas masculinas durante la copulación. Por otra parte, podemos decir que, en términos generales, los tipos celulares de este proceso coinciden con los descriptos por Stephenson para lumbrícidos, en base a los trabajos de Bugnion y Popoff (1), agregándose un nuevo tipo celular que es el de las protogonias.

Consideramos que los resultados detallados son representativos de una etapa más avanzada en el desarrollo de los estudios de este tema, realizados hasta el presente por medio de cortes histológicos. En efecto, esta metodología clásica no permite una definición clara e individual de las agrupaciones celu

lares ya que interrumpe, en muchos casos, la continuidad de las mismas, acorde al lugar en que se produce el corte, y, por otra parte, acarrea el problema de superposición de ellas en el campo. Es así que las técnicas empleadas han permitido corroborar y ampliar los conocimientos de los elementos celulares dispersos, como asimismo de las agrupaciones, tanto en lo que a aspectos cualitativos y cuantitativos se refieren.

BIBLIOGRAFIA

1. BUGNION, E. y POPOFF, 1905. La spermatogénèse du lombric terrestre. Comptes Rendus du VI Congrès International de Zoologie. Genève, pp. 410-420.
2. CARR, D. H. y WALKER, J. E., 1961. Stain Technology, *36:* 233.
3. CHATTON, E. y TUZET, O., 1941. Sur quelques faits nouveaux de la spermatogénèse du *Lumbricus terrestris*. C. R. Acad. Sci. *213:* 373-376.
4. DULOUT, F. N. et al,, 1966. Los tipos celulares en la espermatogénesis de *Pheretima californica* Kinberg (Megascolecidae, Oligochaeta) Accta Zool. Lill. *24*, pp. 177-182.
5. DULOUT, F. N. et al., 1966. La espermatogénesis de *Pheretima hawayana* (Rosa.) (Megascolecidae, Oligochaeta). Rev. Agron. N. O. Argent. 7 (3-4): 603-612.
6. DUPRAW, E. J., 1970. DNA and Chromosomes. Holt, Rinehart and Winston, Inc.
7. GAVRILOV, K., 1948. Sobre la reproducción uni y biparental de los Oligoquetos. Acta Zool. Lill. *5:* 221-311.
8. OMODEO, P.. 1952. Cariología dei Lumbricidae. Caryologia *4:* 173-275.
9. PANTIN, C. F. A., 1948. Notes on microscopical technique for zoologists. Cambridge University Press.
10. STEPHENSON, P., 1930. The Oligochaeta. Oxford University Press.
11. VERNA, LUIS C., 1945. Técnicas geuerales y de experimentación bacteriológica, pp. 331 1945.

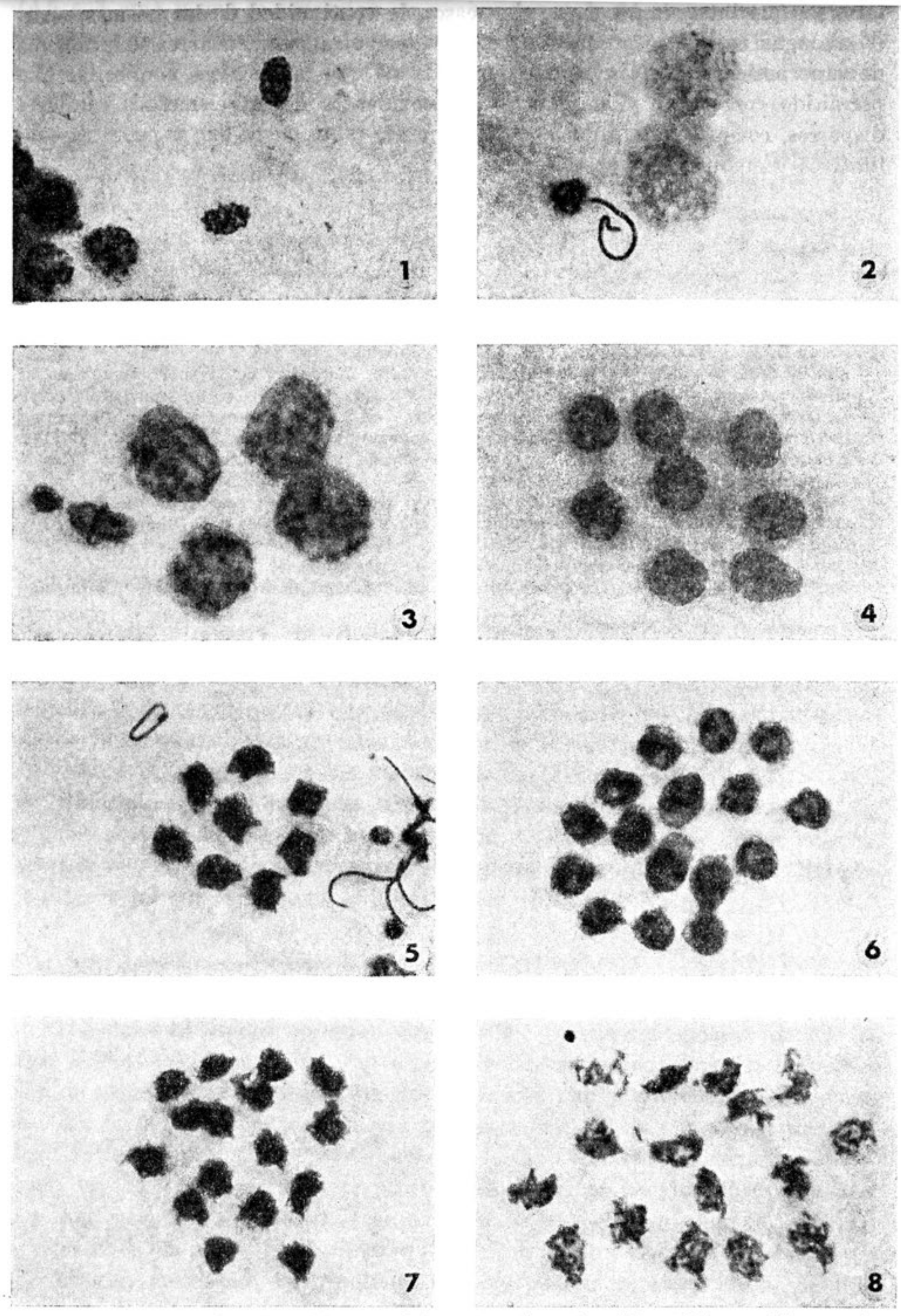


Foto 1. — Protogonias de núcleos ovalados; tamaño entre 7,5 a 10,5 μm. Giemsa. Aumento 1000 x. Foto 2. — Espermatogonias de núcleos esféricos; agrupadas en número de dos elementos. Giemsa. Aumento 600 x. Foto 3. — Espermatogonias en grupo de cuatro elementos. Giemsa. Aumento 1000 x Foto 4. — Espermatogonias en grupo de ocho elementos. Giemsa. Aumento 1000 x. Foto 5. — Grupo de ocho espermatogonias en profase mitótica. Giemsa. Aumento 1000 x. Foto 6. — Espermatogonias en grupo de dieciséis elementos. Giemsa. Aumento 1000.x. Foto 7. — Grupo de dieciséis espermatogonias en profase mitótica. Giemsa. Aumento 1000 x. Foto 8. — Grupo de dieciséis espermato-

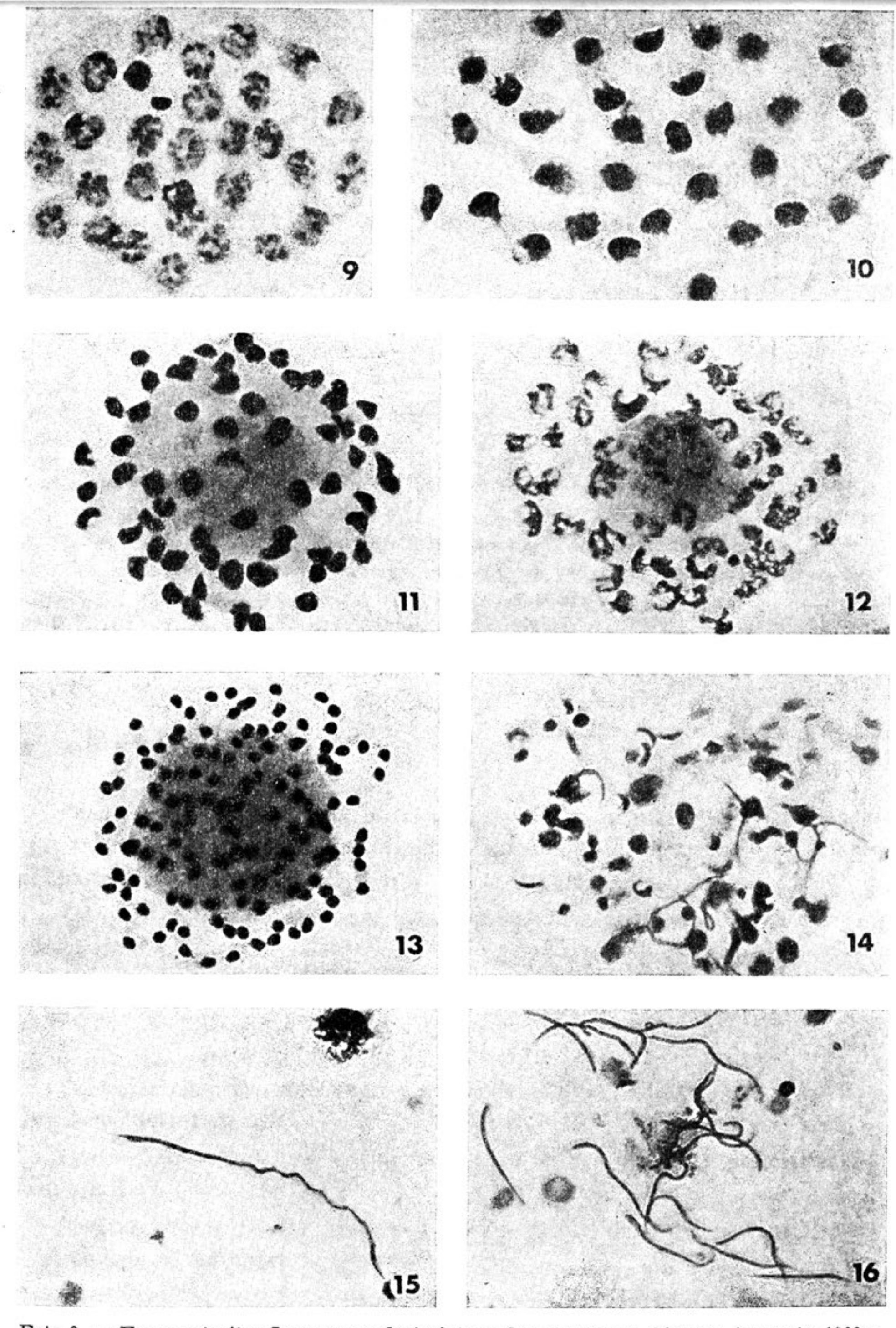


Foto 9. — Espermatocitos I en grupo de treinta y dos elementos. Giemsa. Aumento 1000 x. Foto 10. — Espermatocitos I en profase. Giemsa. Aumento 1000 x. Foto 11. — Espermatocitos II en grupo de sesenta y cuatro elementos. Giemsa. Aumento 1000 x. Foto 12. — Espermatocitos II en profase. Giemsa. Aumento 600 x. Foto 13. — Espermátidas (ciento veintiocho elementos). Giemsa. Aumento 1000 x. Foto 14. — Espermiogénesis: formas de transición entre espermátidas y espermatozoides maduros. Giemsa. Aumento 1000 x. Foto 15. — Detalle de región cefálica de un espermatozoide. Gram - Nicolle. Aumento 1000 x Foto 16. — Cromosomas alineados en las cabezas de los espermatozoides. Giemsa.